

**ОПТИМИЗАЦИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ  
РЕКОМБИНАНТНОГО ФЬЮЖН–БЕЛКА  
SUMO–ESC–B(1–20)**

*Сауткина Наталья Владимировна<sup>1</sup>, ассистент,  
Бусленко Анна Владимировна<sup>2</sup>, инженер лаборатории,  
Прокулевич Владимир Антонович<sup>1</sup>, д.б.н., профессор,  
заведующий кафедрой микробиологии*

*<sup>1</sup>Белорусский государственный университет*

*<sup>2</sup>РУП "Институт мясо–молочной промышленности"*

**Введение.** Катионные пептиды земноводных обладают высокой антибактериальной активностью в отношении широкого спектра бактерий и поэтому являются перспективными компонентами новых лекарственных средств для борьбы с антибиотикорезистентными штаммами патогенных бактерий [1].

Катионный пептид эскулентин–b(1–20) (Esc–b(1–20)), сохраняет свойства антимикробного пептида эскулентина–1b лягушки (*Rana esculenta* L., 1758), являясь его N–концевым производным [2]. Пептид Esc–b(1–20) ранее получен в клетках штамма *Escherichia coli* BL21–CodonPlus(DE3)–RIPL в составе рекомбинантного фьюжн–белка SUMO–Esc–b(1–20), в котором фьюжн–партнером пептида выступает анионный белок – малый убиквитин–подобный модификатор дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (SUMO) [3]. Присоединение белка SUMO, снабженного гистидиновой меткой, к пептиду Esc–b(1–20) способствует повышению уровня экспрессии всего фьюжн–белка, его растворимости, а также проведению металл–хелатной хроматографии. Целью данной работы является оптимизация процесса хроматографической очистки рекомбинантного фьюжн–белка SUMO–Esc–b(1–20).

**Материалы и методы.** Клетки штамма–продуцента белка SUMO–Esc–b(1–20) разрушали гомогенизатором высокого давления Panda Plus 2000 (GEA Niro Soavi) и с помощью ультразвукового гомогенизатора Bandelin 3100 (Bandelin Electronic GmbH) согласно инструкциям производителей. В таблице представлены буферы, использованные для разрушения клеток.

Таблица – Буферные растворы для разрушения клеток

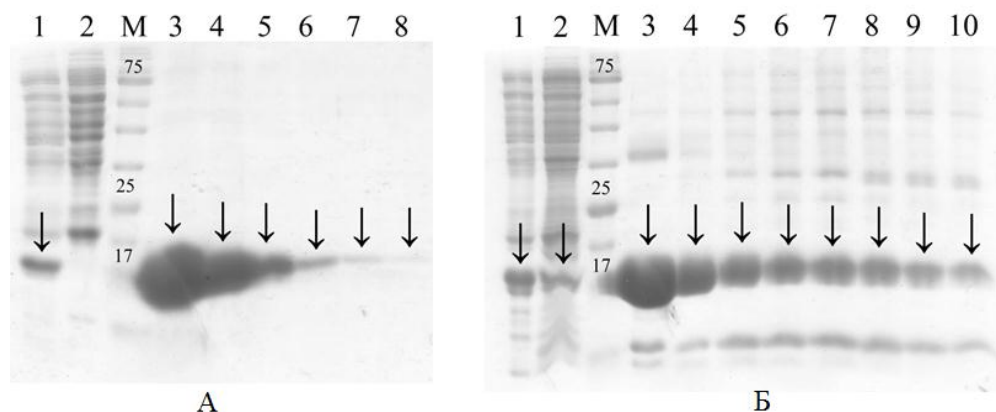
Буфер	Состав буфера	Значение pH буфера
1	50 ммоль/л трис–HCl; 2,5 ммоль/л MgCl <sub>2</sub>	pH 8,5
2	50 ммоль/л трис–HCl; 2,5 ммоль/л MgCl <sub>2</sub> ; 0,5 моль NaCl	pH 8,5
3	50 ммоль/л NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 2,5 ммоль/л MgCl <sub>2</sub>	pH 5,6
4	50 ммоль/л NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 2,5 ммоль/л MgCl <sub>2</sub> ; 0,5 моль/л NaCl	pH 5,6

Хроматографическую очистку фьюжн–белка проводили на сорбенте HisPur™ Ni–NTA Superflow Agarose (Thermo Scientific) согласно рекомендациям производителя сорбента. Для определения заряда и изоэлектрической точки фьюжн–белка использовали приложение EditSeq пакета программ Lasergene (DNASTAR). Цифровые изображения окрашенных полиакриламидных гелей (ПААГ) анализировали при помощи программы ImageJ (National Institutes of Health).

**Результаты исследования.** Поскольку фьюжн–белок SUMO–Esc–b(1–20) при 37 °C в клетках *E. coli* накапливается в равной степени как в растворимой, так и нерастворимой форме [3], после наработки белка бактериальные клетки разрушали френч–прессом в стандартном буфере для разрушения клеток (50 ммоль/л трис–HCl; 10 ммоль/л MgCl<sub>2</sub>; 5 ммоль/л CaCl<sub>2</sub>; 0,5 моль/л NaCl; pH 8,0) и проводили металл–хелатную хроматографию супернатанта клеточного гомогената.

Во время проведения хроматографической очистки выяснилось, что клеточный белок выпадает в осадок на колонке, а также то, что в профильтрованном супернатанте клеточного гомогената также образуется осадок клеточных белков, по–видимому, вследствие непригодности стандартного буфера для разрушения клеток из–за его состава, в частности большой концентрации магния хлорида и наличия кальция хлорида. Поэтому на следующем этапе работы подбирали подходящий буфер для разрушения клеток, в котором белок не будет выпадать в осадок и очистится в полном объеме. Для этого 1 г клеток бактерий разрушали с помощью ультразвука в 10 мл буферов, отличающихся по составу и pH (буферы 1, 2, 3, 4 и уравнивающий буфер для металл–хелатной хроматографии, который использовали при первой очистке). Профильтрованные супернатанты гомогенатов оставляли на сутки при температуре +4 °C, затем визуально анализировали растворы. В результате установили, что наименьшее количество осадка образуется в гомогенатах на основе буферов с pH, отличным на 1,5 значения в большую или меньшую сторону от изоэлектрической точки фьюжн–белка SUMO–Esc–b(1–20) равной 7,1, а именно буферов 2 (pH 8,5) и 4 (pH 5,6). Эти буферы включают в свой состав магния хлорид и натрия хлорид, но отличаются соединением, обеспечивающим буферность: в буфере 2 это трис–HCl, а в буфере 4 – натрия дигидрофосфат.

Поэтому далее клетки разрушали в буферах 2 и 4 френч–прессом, а осветлённые центрифугированием гомогенаты подвергали афинной металл–хелатной хроматографии (рисунок).



А – очистка белка после разрушения клеток в буфере 2; Б – очистка белка после разрушения клеток в буфере 4; 1 – профильтрованный супернатант клеточного гомогената, содержащий белок SUMO-Esc-b(1–20); 2 – фракция белков, не связавшихся с сорбентом;

3–10 – фракции элюции белка SUMO-Esc-b(1–20); М – маркер молекулярного веса Protein Marker VI (10–245) prestained (PanReac AppliChem). Стрелками указан очищенный фьюжн–белок, цифры на маркере молекулярного веса обозначают массу в кДа.

**Рисунок – Электрофореграмма результатов хроматографической очистки белка SUMO-Esc-b(1–20) после разрушения клеток–продуцентов в буферах 2 и 4**

При нанесении образцов в буфере 4 наблюдалось лучшее связывание целевого продукта с сорбентом: содержание SUMO-Esc-b(1–20) в проскоке всего 0,5 %, по сравнению с 10 % для буфера 2 (рисунок 1А, 1Б, дорожки 2); и более острый пик элюции: более 95 % белка элюировалось менее чем тремя объёмами колонки (рисунок 1Б, дорожки 3–8).

Таким образом, для разрушения клеток–продуцентов с последующей хроматографической очисткой фьюжн–белка SUMO-Esc-b(1–20) подходят буферы 2 (50 ммоль/л трис–HCl; 2,5 ммоль/л MgCl<sub>2</sub>; 0,5 моль NaCl; pH 8,5) и 4 (50 ммоль/л NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,5 ммоль/л MgCl<sub>2</sub>; 0,5 моль/л NaCl; pH 5,6), поскольку в них белки супернатанта клеточного гомогената не выпадают в осадок, однако после разрушения клеток в буфере 4 хроматографическая очистка белка проходит эффективнее.

#### **Список использованных источников**

1. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations / M.N. Melo [et al.] // Nature reviews Microbiology. – 2009. – Vol. 7, No 3. – P. 245–250.
2. Esculentin-1b(1–18) – a membrane-active antimicrobial peptide that synergizes with antibiotics and modifies the expression level of a limited number of proteins in *Escherichia coli* / L. Marcellinii [et al.] // The FEBS Journal. – 2009. – Vol. 276, No 19. – P. 5647–5664.

3. Получение рекомбинантного фьюжн-белка SUMO-Esc-b(1–20), включающего N-концевой фрагмент антимикробного пептида эскулентина-1b / А.В. Бусленко [и др.] // Биология – наука XXI века: сборник тезисов 22-ой Международной Пушкинской школы-конференции молодых ученых, Пущино, 23–27 апреля 2018 г. / Пушкинский науч. центр РАН, Пушкинский гос. ун-т; редкол.: А.И. Мирошников [и др.]. – Пущино, 2018. – С. 67–68.